

Docket No. 220081US btm

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Takahiro MARUYAMA, et al.

GAU: 1645

SERIAL NO: 10/085,056

EXAMINER:

FILED: March 1, 2002

FOR: OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DETECTING VEROTOXIN

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §120**.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119(e)**.
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119**, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2001-058143	March 2, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Roland E. Martin
Registration No. 48,082

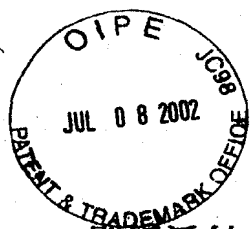


22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

RECEIVED
JUL -9 2002
TECHNOLOGY CENTER 1700

RECEIVED
JUL 11 2002
TECH CENTER 1600/2900



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 3月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-058143

[ST.10/C]:

[JP2001-058143]

出 願 人

Applicant(s):

東ソー株式会社

RECEIVED
JUL -9 2002
TECHNOLOGY CENTER 1700

RECEIVED
JUL 11 2002
TECH CENTER 1600/2900

2002年 3月 1日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2002-3012030

1

【書類名】明細書

【発明の名称】ベロ毒素検出のためのオリゴヌクレオチドおよび検出法

【特許請求の範囲】

【請求項1】ベロ毒素1型(Vero toxin 1、以下VT1と略称する)の遺伝子要素であるVT1遺伝子又は該遺伝子に由来するRNA(以下VT1 RNAと略称する)を、検出又は増幅するためのオリゴヌクレオチドであって、VT1 RNAに特異的に結合可能である、配列番号1から5に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上を含む配列を特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項2】ベロ毒素2型(Vero toxin 2、以下VT2と略称する)の遺伝子要素であるVT2遺伝子又は該遺伝子に由来するRNA(以下VT2 RNAと略称する)を、検出又は増幅するためのオリゴヌクレオチドであって、VT2 RNAに特異的に結合可能である、配列番号6から14に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上を含む配列を特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項3】試料中に存在するVT1 RNAの特定配列を鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼによりcDNAを合成し、リボヌクレエースHによってRNA・DNAハイブリッドのRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記特定配列又は前記特定配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成し、そして該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによるcDNA合成の鋳型となるようなRNA増幅工程において、VT1 RNA配列に特異的に結合可能である配列番号1から5に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号15から18に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第二のオリゴヌクレオチド(ここで第一又は第二のオリゴヌクレオチドのいずれか一方は、その5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む)を用いることを特徴とするVT1 RNAの検出方法。

【請求項4】試料中に存在するVT2 RNAの特定配列を鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼによりcDNAを合成し、リボヌクレオースHによってRNA・DNAハイブリッドのRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記特定配列又は前記特定配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成し、そして該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによるcDNA合成の鋳型となるようなRNA増幅工程において、VT2 RNA配列に特異的に結合可能である配列番号6から14に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号19から23に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第二のオリゴヌクレオチド（ここで第一又は第二のオリゴヌクレオチドのいずれか一方は、その5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む）を用いることを特徴とするVT2 RNAの検出方法。

【請求項5】前記増幅を、増幅により生じるRNA転写産物と特異的に結合可能であり、かつ、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定する操作を実施することからなる、請求項3又は請求項4に記載の検出方法（ただし該標識されたオリゴヌクレオチドは、前記第一のオリゴヌクレオチド及び第二のオリゴヌクレオチドとは異なる配列である）。

【請求項6】前記オリゴヌクレオチドプローブは、RNA転写産物の少なくとも一部の配列と相補結合するように設計され、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする請求項5に記載の検出方法。

【請求項7】前記オリゴヌクレオチドプローブは、配列番号24に示した配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる配列又はその相補配列である、請求項5に記載のVT1 RNAの検出方法。

【請求項8】前記オリゴヌクレオチドプローブは、配列番号25に示した配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる配列又はその相補配列である、請

求項5に記載のVT2 RNAの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、臨床検査、公衆衛生、食品検査、食中毒検査におけるベロ毒素（*Verotoxin*、以下VTと略称する）の検出用のオリゴヌクレオチドや該オリゴヌクレオチドを使用した検出方法に関するものである。本願発明で提供されるオリゴヌクレオチドは、RNAやDNAの切断、増幅そして検出といった操作を行なう遺伝子診断用の試薬として、VTの定量や診断用の試薬等に有用である。

【0002】

【従来の技術】

ベロ毒素は、病原性大腸菌O157を代表とするベロ毒素産生性大腸菌（*Verotoxin-producing Escherichia coli*、以下VTECと略称する）が産生する強力な毒素である。VTECによる感染症の主な症状は出血性大腸炎に代表される食中毒であるが、場合により溶血性尿毒症症候群（*Hemolytic Uremic Syndrome*、HUS）へと重症化し、最悪の場合では死に至るケースも報告されている。

【0003】

VTECの血清型は60種類以上と非常に多彩であるが、検出頻度からみると主体を占めるのはO157:H7である。またVTには、志賀赤痢菌（*Shigella dysenteriae*）の産生する志賀毒素（*Shiga toxin*）と同一構造のVT1型と、物理化学的性状及び免疫学的性状を異にするVT2型が存在する。

【0004】

近年我が国でも大規模なVTEC集団感染が多発しており、感染源の早期発見と除去を目的として迅速な検出法が望まれている。さらに臨床的見地からは症状の初期、即ち発症から数日以内の抗生物質を含む抗菌剤の投与が有効であることが明らかにされており、菌の迅速な同定が重要な課題となっている。

【0005】

これまでに用いられてきたVTの診断手段として、O157抗原検査がある。しかし一部のサルモネラ菌やシトロバクター菌はO157抗原との交差抗原性を有することが知られており、判定の結果疑似陽性を示すケースが報告されている。またO157以外の血清型による集団感染の事例も報告されており、この場合様々な血清型に対する抗血清を用いた試験を行なう必要がある。

【0006】

また近年では、VTECの遺伝子と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを作製し、これをプライマーとして用いる遺伝子増幅法（PCR法）を行なうことにより、ベロ毒素産生菌を選択的に検出する方法が提案されているが、増幅後のDNA断片の確認をアガロース電気泳動により行なっているため、迅速検出という点で課題がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

VTの場合は、他の食中毒と比べ少ない汚染菌量で重大な被害をもたらすことから、食品検査等にさらに迅速かつ高感度な検出法の出現が望まれているが、前述したとおり、従来法では迅速性及び簡便性という点で課題がある。また、検査をより簡便にするために、検出を自動化する検査装置の開発も要求されている。

【0008】

RNAの特定配列の増幅法としては、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法が知られている。この方法は、逆転写工程で標的RNAのcDNAを合成し、引き続いてcDNAの特定配列の両末端部に相補的及び相同な一組のプライマー（アンチセンスプライマーは逆転写工程と共用でよい）と熱耐性DNAポリメラーゼ存在下で、熱変性、プライマー・アニール、伸長反応からなるサイクルを繰り返し行うことによって特定DNA配列を増幅する方法である。しかし、RT-PCR法は、2段階の操作（逆転写工程及びPCR工程）、及び、急激な昇温・降温を繰り返す操作が必要であり、そのことが自動化への障害となる。

【0009】

特定RNA配列の増幅法としては、上記以外に、逆転写酵素及びRNAポリメラーゼの協奏的作用によって特定RNA配列を増幅するNASBA法や3SR法等が知られている。この方法は、標的RNAを鋳型とし、プロモーター配列を含むプライマー、逆転写酵素、及びリボヌクレオースHにより、プロモーター配列を含む2本鎖DNAを合成し、該2本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼにより、標的RNAの特定塩基配列を含むRNAを合成し、該RNAが引き続きプロモーター配列を含む2本鎖DNA合成の鋳型となる連鎖反応を行うものである。

【0010】

このようにNASBA法や3SR法は一定温度での核酸増幅が可能であり、自動化へ適している方法だと考えられる。

【0011】

しかしながら、NASBA法や3SR法等の増幅法では、操作を比較的低温（例えば41℃）で反応を行うために、標的RNAが分子内構造を形成し、プライマーの結合を阻害し、反応効率を低下させる可能性が考えられる。したがって、従来は、増幅反応の前に標的RNAの熱変性を行うことで、標的RNAの分子内構造を壊し、プライマーの結合効率を向上させるための操作が必要であり、操作の迅速性及び簡便性という点で課題が残されていた。

【0012】

そこで本願発明は、標的RNAの分子内構造フリーな領域に対して特異的に相補結合可能で、操作を比較的低温（35℃から50℃、好ましくは41℃）で行った場合でも標的RNAへの結合が阻害されず、したがって反応効率を低下させることのないオリゴヌクレオチドの提供を目的とする。より具体的には、比較的低温かつ一定温度で、VT1 RNA又はVT2 RNAの分子内構造フリー領域に対して結合するオリゴヌクレオチドや、VT1 RNA又はVT2 RNAを検出するためのオリゴヌクレオチド等の、核酸増幅法で使用されるオリゴヌクレオチドプライマーの提供と、それを利用した簡便、迅速かつ高感度な検出方法の提供を目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために成された本願請求項1の発明は、VT1 RNAを検出又は増幅するためのオリゴヌクレオチドであって、VT1 RNAに特異的に結合可能である、配列番号1から5に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上を含む配列を特徴とするオリゴヌクレオチドである。また前記目的を達成するために成された本願請求項2の発明は、VT2 RNAを検出又は増幅するためのオリゴヌクレオチドであって、VT2 RNAに特異的に結合可能である、配列番号6から14に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上を含む配列を特徴とするオリゴヌクレオチドである。

【0014】

また本願請求項3の発明は、VT1 RNAの検出方法であり、試料中に存在するVT1 RNAの特定配列を鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼによりcDNAを合成し、リボヌクレースHによってRNA・DNAハイブリッドのRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記特定配列又は前記特定配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成し、そして該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによるcDNA合成の鋳型となるようなRNA増幅工程において、VT1 RNA配列に特異的に結合可能である配列番号1から5に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号15から18に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第二のオリゴヌクレオチド（ここで第一又は第二のオリゴヌクレオチドのいずれか一方は、その5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む）を用いることを特徴とする。また本願請求項4の発明は、VT2 RNAの検出方法であり、試料中に存在するVT2 RNAの特定配列を鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼによりcDNAを合成し、リボヌクレースHによってRNA・DNAハイブリッドのRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記特定配列又は前

記特定配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成し、そして該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによるcDNA合成の鋳型となるようなRNA増幅工程において、VT2 RNA配列に特異的に結合可能である配列番号6から14に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号19から23に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる第二のオリゴヌクレオチド（ここで第一又は第二のオリゴヌクレオチドのいずれか一方は、その5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む）を用いることを特徴とする。

【0015】

本願請求項5の発明は、前記請求項3又は4の発明に係り、前記増幅を、増幅により生じるRNA転写産物と特異的に結合可能であり、かつ、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定する操作を実施することからなる。本願請求項6の発明は、前記請求項5の発明に係り、前記オリゴヌクレオチドプローブが、RNA転写産物の少なくとも一部の配列と相補結合するように設計され、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする。本願請求項7の発明は、前記請求項5の発明に係り、前記オリゴヌクレオチドプローブが配列番号24に示した配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる配列又はその相補配列である、VT1 RNAの検出方法である。本願請求項8の発明は、前記請求項5の発明に係り、前記オリゴヌクレオチドプローブが配列番号25に示した配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなる配列又はその相補配列である、VT2 RNAの検出方法である。以下、本願発明を詳細に説明する。

【0016】

まず本願発明は、VT1 RNAを検出するために有用なオリゴヌクレオチドであって、VT1 RNAに特異的に結合可能である、配列番号1から5に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上から成るオリゴヌクレオ

チドである。このオリゴヌクレオチドは比較的低温かつ一定温度（35℃から50℃、好ましくは41℃）で、VT1 RNAに特異的に結合可能である。

【0017】

そして本願発明が提供する、試料中のVT1 RNAを増幅する工程を含むRNAの検出方法は、核酸増幅工程としてPCR法、NASBA法、3SR法等のいずれかを含むが、中でも逆転写酵素及びRNAポリメラーゼの協奏的作用によって（逆転写酵素及びRNAポリメラーゼが協奏的に作用するような条件下で反応させ）VT1 RNA中の特定配列を増幅するNASBA法又は3SR法等の、一定温度条件下で実施できる核酸増幅法が好ましい。

【0018】

例えばNASBA法は、試料中に存在するVT1 RNAの特定配列を鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーゼによりcDNAを合成し、リボヌクレースHによってRNA・DNAハイブリッドのRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記特定配列又は前記特定配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する二本鎖DNAを生成し、そして該二本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによるcDNA合成の鋳型となるようなRNA増幅工程であるが、本願発明ではVT1 RNAに特異的に結合可能である配列番号1から5に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上から成る第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号15から18に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上から成る、増幅されるVT1 RNA配列の一部と相同な配列を有する第二のオリゴヌクレオチド（ここで第一又は第二のオリゴヌクレオチドのいずれか一方は、その5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む）を用いることを特徴とする。

【0019】

RNA依存性DNAポリメラーゼ、DNA依存性DNAポリメラーゼ、リボヌクレースHは特に限定されないが、これらの活性のすべてを有しているAMV逆転写酵素が好ましい。また、RNAポリメラーゼについても特に限定されない

が、T7ファージRNAポリメラーゼ、SP6ファージRNAポリメラーゼが好ましい。

【0020】

上記増幅工程では、VT1 RNA配列の中で特定配列とする領域の5'末端領域と重複（1から10塩基）して隣接する領域に対して相補的なオリゴヌクレオチドを添加し、前記VT1 RNAを特定配列の5'末端領域で切断（リボヌクレエースHによる）して核酸増幅初期の鋳型とすることにより、特定配列が5'端に位置していないVT1 RNAをも増幅することが出来る。この切断のためには、例えば配列番号1から5のオリゴヌクレオチド（ただし、前記増幅工程において第一のオリゴヌクレオチドとして使用したもの以外のオリゴヌクレオチド）を使用する事が出来る。なお、この切断用オリゴヌクレオチドは、3'末端からの伸長反応を抑えるために、3'水酸基が化学的に修飾（たとえばアミノ化）されたものであることが望ましい。

【0021】

以上の核酸増幅工程で得られるRNA転写産物は既知の検出方法で検出する事が出来るが、前記増幅工程をインターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定する事が好ましい。このオリゴヌクレオチドプローブとしては、オリゴヌクレオチド中のリンにリンカーを介してインターカレーター性蛍光色素を結合させたものが例示出来る。この好適なプローブでは、標的核酸（相補的核酸）と二本鎖を形成するとインターカレーター部分が二本鎖部分にインターカレートして蛍光特性が変化するため、分離分析を必要としない（Ishiguro, Tら（1996）Nucleic Acids Res. 24（24）4992-4997）。

【0022】

前記プローブの配列は、RNA転写産物の少なくとも一部に対して相補的な配列を有すれば特に限定されないが、配列番号24に示した配列の少なくとも連続した10塩基以上から成る配列が好ましい。またプローブをプライマーとした伸長反応を抑えるために、プローブの3'末端の水酸基は化学的に修飾（たとえばグリコール酸付加）することが望ましい。

【0023】

上記のようなプローブ共存下で増幅工程を行なう事により、VT1 RNAの中の特定配列と同じ配列から成るRNAを、一チューブ内、一定温度、一段階で増幅し検出する事が可能となり、自動化への適用も容易となる。

【0024】

次に本願発明は、VT2 RNAを検出するために有用なオリゴヌクレオチドであって、VT2 RNAに特異的に結合可能である、配列番号6から14に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上から成るオリゴヌクレオチドである。このオリゴヌクレオチドは比較的低温かつ一定温度（35℃から50℃、好ましくは41℃）で、VT2 RNAに特異的に結合可能である。

【0025】

そして本願発明が提供する、試料中のVT2 RNAを増幅する工程を含むRNAの検出方法は、核酸増幅工程としてPCR法、NASBA法、3SR法等のいずれかを含むが、中でも逆転写酵素及びRNAポリメラーズの協奏的作用によって（逆転写酵素及びRNAポリメラーズが協奏的に作用するような条件下で反応させ）VT2 RNA中の特定配列を増幅するNASBA法又は3SR法等の、一定温度条件下で実施できる核酸増幅法が好ましい。

【0026】

例えばNASBA法は、試料中に存在するVT2 RNAの特定配列を鋳型として、RNA依存性DNAポリメラーズによりcDNAを合成し、リボヌクレースHによってRNA・DNAハイブリッドのRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーズにより、前記特定配列又は前記特定配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する二本鎖DNAを生成し、そして該二本鎖DNAがRNAポリメラーズ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーズによるcDNA合成の鋳型となるようなRNA増幅工程であるが、本願発明ではVT2 RNAに特異的に結合可能である配列番号6から14に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上から成る第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号19から23に示したいずれかの

配列中の少なくとも連続した10塩基以上から成る、増幅されるVT2 RNA配列の一部と相同な配列を有する第二のオリゴヌクレオチド（ここで第一又は第二のオリゴヌクレオチドのいずれか一方は、その5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む）を用いることを特徴とする。

【0027】

RNA依存性DNAポリメラーゼ、DNA依存性DNAポリメラーゼ、リボヌクレオースHは特に限定されないが、これらの活性のすべてを有しているAMV逆転写酵素が好ましい。また、RNAポリメラーゼについても特に限定されないが、T7ファージRNAポリメラーゼ、SP6ファージRNAポリメラーゼが好ましい。

【0028】

上記増幅工程では、VT2 RNA配列の中で特定配列とする領域の5'末領域と重複（1から10塩基）して隣接する領域に対して相補的なオリゴヌクレオチドを添加し、前記VT2 RNAを特定配列の5'末領域で切断（リボヌクレオースHによる）して核酸増幅初期の鋳型とすることにより、特定配列が5'端に位置していないVT2 RNAをも増幅することが出来る。この切断のためには、例えば配列番号6から14のオリゴヌクレオチド（ただし、前記増幅工程において第一のオリゴヌクレオチドとして使用したもの以外のオリゴヌクレオチド）を使用する事が出来る。なお、この切断用オリゴヌクレオチドは、3'末端からの伸長反応を抑えるために、3'末端の水酸基が化学的に修飾（たとえばアミノ化）されたものであることが望ましい。

【0029】

以上の核酸増幅工程で得られるRNA転写産物は既知の検出方法で検出する事が出来るが、前記増幅工程をインターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定する事が好ましい。このオリゴヌクレオチドプローブとしては、オリゴヌクレオチド中のリンにリンカーを介してインターカレーター性蛍光色素を結合させたものが例示出来る。この好適なプローブでは、標的核酸（相補的核酸）と二本鎖を形成するとインターカレーター部分が二本鎖部分にインターカレートして蛍光特性が変化

するため、分離分析を必要としない (Ishiguro, Tら (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (24) 4992-4997)。

【0030】

前記プローブの配列は、RNA転写産物の少なくとも一部に対して相補的な配列を有すれば特に限定されないが、配列番号25に示した配列の少なくとも連続した10塩基以上から成る配列が好ましい。またプローブをプライマーとした伸長反応を抑えるために、プローブの3'末端の水酸基は化学的に修飾（たとえばグリコール酸付加）することが望ましい。

【0031】

上記のようなプローブ共存下で増幅工程を行なう事により、VT2 RNAの中の特定配列と同じ配列から成るRNAを、一チューブ内、一定温度、一段階で増幅し検出する事が可能となり、自動化への適用も容易となる。

【0032】

【発明の実施形態】

以下、本願発明を実施例により更に詳細に説明するが、本願発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0033】

実施例1

VT1 RNAに対し、41℃という比較的低温で特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択した。VT1 RNA塩基配列 (Calderwood, S. B. 他、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*、84、4364-4368 (1987)、米国Gen Bank登録番号M16625) の塩基番号228から1558の領域を含む標準RNAを、260nmの紫外部吸収により定量後、RNA希釈液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.5U/μl RNase Inhibitor) を用い1.33pmol/μlとなるよう希釈した。

【0034】

以下の組成の反応液14.0μlを0.5ml容のPCR用チューブ (商品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes

、パーキンエルマー製)に分注した。

【0035】

(反応液の組成)

60.0 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.6)

90.0 mM 塩化カリウム

13.0 mM 塩化マグネシウム

1.0 mM DTT

80.0 nM 標準RNA

0.8 μ M オリゴヌクレオチド (以下に示した配列のオリゴヌクレオチド)

(オリゴ-1) : 配列番号1

(オリゴ-2) : 配列番号2

(オリゴ-3) : 配列番号26

(オリゴ-4) : 配列番号3

(オリゴ-5) : 配列番号4

(オリゴ-6) : 配列番号5

容量調整用蒸留水

上記の反応液を41℃で5分間保温後、8.0 U/ μ lのAMV逆転写酵素 (宝酒造 (株) 製) を1 μ l添加した (AMV逆転写酵素は、DNA/RNA二本鎖のRNAを切断する活性を有する酵素である)。

【0036】

引き続きPCRチューブを41℃に10分間保温した。反応後の切断断片を確認するため、尿素変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド濃度は6%、尿素7M) 電気泳動を実施した。電気泳動後の染色は市販の染色液 (商品名 ; SYBR Green II、宝酒造 (株) 製) により行った。標的RNAの特定部位にオリゴヌクレオチドが結合すると、AMV逆転写酵素が有するRNase H活性により、DNA/RNA二本鎖のRNAが切断され、特定バンドが観察される。

【0037】

電気泳動の結果（白黒反転図）を図1に示した。オリゴヌクレオチドが標準RNAに特異的に結合した場合、標準RNAはその領域で分解され、特定の鎖長の分解産物を生ずる。表1には、オリゴヌクレオチドが標準RNAに特異的に結合した場合の位置と期待されるバンドの鎖長を示した。オリゴ-1からオリゴ6は、期待される位置での切断が確認された。以上から、これらのオリゴヌクレオチドは、41℃一定の状態でVT1 RNAに強く結合している事が示された。

【0038】

【表1】

オリゴ名	位置 ¹⁾	期待されるバンド長 (base)
オリゴ-1	425	425、912
オリゴ-2	555	555、782
オリゴ-3	710	710、627
オリゴ-4	890	890、447
オリゴ-5	980	980、357
オリゴ-6	1031	1031、306

1) 位置はVT1 RNA標準品(1337 base)に対する、結合するオリゴの5'末端の番号

実施例2

VT2 RNAに対して、41℃で特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択した。VT2 RNA塩基配列(Schmitt, C. K. 他、Infect. Immun. 59、1065-1073 (1991)、米国Gen Bank登録番号X07865)の塩基番号81から1437の領域を含む標準RNAを、260nmの紫外部吸収により定量後、RNA希釈液(10mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.5U/ μ l RNase Inhibitor)を用い1.75pmol/ μ lとなるよう希釈した。

【0039】

以下の組成の反応液14.0 μ lを0.5ml容のPCR用チューブ(商品名

; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes
、パーキンエルマー製)に分注した。

【0040】

(反応液の組成)

60.0 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.6)

90.0 mM 塩化カリウム

13.0 mM 塩化マグネシウム

1.0 mM DTT

80.0 nM 標準RNA

0.8 μ M オリゴヌクレオチド (以下に示した配列のオリゴヌクレオチド)

(オリゴ-7) : 配列番号6

(オリゴ-8) : 配列番号7

(オリゴ-9) : 配列番号8

(オリゴ-10) : 配列番号9

(オリゴ-11) : 配列番号10

(オリゴ-12) : 配列番号11

(オリゴ-13) : 配列番号12

(オリゴ-14) : 配列番号13

(オリゴ-15) : 配列番号14

容量調整用蒸留水

上記の反応液を、41℃で5分間保温後、8.0 U/ μ lのAMV逆転写酵素(宝酒造(株)製)を1 μ l添加した(AMV逆転写酵素は、DNA/RNA二本鎖のRNAを切断する活性を有する酵素である)。

【0041】

引き続きPCRチューブを41℃に10分間保温した。反応後の切断断片を確認するため、尿素変性ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド濃度は6%、尿素7M)電気泳動を実施した。電気泳動後の染色は市販の染色液(商品名; SYBR Green II、宝酒造(株)製)により行った。標的RNAの特定部

位にオリゴヌクレオチドが結合すると、AMV逆転写酵素が有するRNase H活性により、DNA/RNA二本鎖のRNAが切断され、特定バンドが観察される。

【0042】

電気泳動の結果（白黒反転図）を図2に示した。オリゴヌクレオチドが標準RNAに特異的に結合した場合、標準RNAはその領域で分解され、特定の鎖長の分解産物を生ずる。表2には、オリゴヌクレオチドが標準RNAに特異的に結合した場合の位置と期待されるバンドの鎖長を示した。オリゴ7からオリゴ15は、期待される位置での切断が確認された。以上から、これらのオリゴヌクレオチドは、41℃一定の状態でVT2 RNAに強く結合している事が示された。

【0043】

【表2】

オリゴ名	位置 ¹⁾	期待されるバンド長 (base)
オリゴ ⁺ -7	102	102、1259
オリゴ ⁺ -8	260	260、1101
オリゴ ⁺ -9	365	365、996
オリゴ ⁺ -10	436	436、925
オリゴ ⁺ -11	675	675、686
オリゴ ⁺ -12	723	723、638
オリゴ ⁺ -13	787	787、574
オリゴ ⁺ -14	848	848、513
オリゴ ⁺ -15	986	986、375

1) 位置はVT2 RNA標準品(1361 base)に対する、結合するオリゴの5'末端の番号

実施例3

VT1 RNAに特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いてRNA増幅反応を行なった。

(1) 実施例1と同様のVT1標準RNAをRNA希釈液(10mM Tris

-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor (宝酒造(株)製)、5mM DTT)を用い、それぞれ 10^4 コピー/ 2.5μ l、 10^3 コピー/ 2.5μ lとなるよう希釈した。コントロール試験区(Nega)には希釈液のみを用いた。

(2) 以下の組成の反応液 23.3μ lを0.5ml容のPCRチューブ(商品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製)に分注し、これに上記RNA試料 2.5μ lを添加した。

【0044】

反応液の組成(各濃度は最終反応液量 30μ lにおける濃度)

60mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.6)

17mM 塩化マグネシウム

90mM 塩化カリウム

39U RNase Inhibitor

1mM DTT

各0.25mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

3.6mM ITP

各3.0mMのATP、CTP、GTP、UTP

0.16 μ Mの第1オリゴヌクレオチド

1.0 μ Mの第2オリゴヌクレオチド

1.0 μ Mの第3オリゴヌクレオチド

13% DMSO

容量調整用蒸留水

(3) 第1、第2、第3オリゴヌクレオチドとして、表3の説明に示す配列のオリゴヌクレオチドを用いてRNA増幅反応を行なった。なお、第1、第2、第3オリゴヌクレオチドの組み合わせが表3に示す組み合わせとなるよう溶液を調製した。

(4) この反応液を 41°C で5分間保温後、以下の組成の酵素液 4.2μ lを添加した。

【0045】

酵素液の組成（各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度）

1. 7% ソルビトール

3 μ g 牛血清アルブミン

142U T7RNAポリメラーゼ（ギブコ製）

8U AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）

容量調整用蒸留水

（5）引き続きPCRチューブを41℃で30分間保温した。反応後のRNA増幅部分を確認するため、アガロースゲル（アガロース濃度4%）電気泳動を実施した。電気泳動後の染色は市販の染色液（商品名；SYBR Green II、宝酒造（株）製）により行なった。標的RNAの特定部位にオリゴヌクレオチドが結合すると第2と第3オリゴヌクレオチドに挟まれた部分のRNAが増幅され、特定バンドが観察される。

【0046】

電気泳動結果の写真（白黒反転）を図3と図4に示した。この反応で増幅される特定バンドの鎖長は表3に示した通りである。これより表3に示したオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いたRNA増幅反応において、いずれの組み合わせにおいても特定バンドが確認できたため、これらのオリゴヌクレオチドはVT1の検出に有効であることが示された。

【0047】

【表3】

組み合わせ	第1オリゴヌクレオチドプロローブ	第2オリゴヌクレオチドプロローブ	第3オリゴヌクレオチドプロローブ	増幅産物鎖長 (塩基数)
(a)	5S	5F	6R	141
(b)	6S	6F	7R	166
(c)	6S	6F	8R	346
(d)	7S	7F	8R	191
(e)	7S	7F	9R	281
(f)	8S	8F	9R	101

表3は、本実施例で用いた第1、第2、第3のオリゴヌクレオチドの組み合わせ、及びその組み合わせを用いてRNA増幅反応させた時に増幅される特定バンドの鎖長を示す。第1オリゴヌクレオチドの塩基配列のうち、3'末端の水酸基はアミノ化されている。第2オリゴヌクレオチドの塩基配列のうち5'端1番目の「A」から22番目の「A」までの部分はT7プロモーター配列であり、それに続く23番目の「G」から28番目の「A」までの部分はエンハンサー配列で

ある。

【0048】

第1オリゴヌクレオチド

5 S (配列番号27)

6 S (配列番号28)

7 S (配列番号29)

8 S (配列番号30)

第2オリゴヌクレオチド

5 F (配列番号36)

6 F (配列番号37)

7 F (配列番号38)

8 F (配列番号39)

第3オリゴヌクレオチド

6 R (配列番号2)

7 R (配列番号26)

8 R (配列番号3)

9 R (配列番号4)

実施例4

VT2 RNAに特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いてRNA増幅反応を行なった。

(1) 実施例2と同様のVT2標準RNAをRNA希釈液(10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor (宝酒造(株)製)、5mM DTT)を用い、それぞれ 10^4 コピー/ 2.5μ l、 10^3 コピー/ 2.5μ lとなるよう希釈した。コントロール試験区(Nega)には希釈液のみを用いた。

(2) 以下の組成の反応液 23.3μ lを0.5ml容のPCRチューブ(商品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製)に分注し、これに上記RNA試料 2.5μ lを添加した。

【0049】

反応液の組成（各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度）

60mM Tris-塩酸緩衝液（pH8.6）

17mM 塩化マグネシウム

90mM 塩化カリウム

39U RNase Inhibitor

1mM DTT

各0.25mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

3.6mM ITP

各3.0mMのATP、CTP、GTP、UTP

0.16 μ Mの第1オリゴヌクレオチド

1.0 μ Mの第2オリゴヌクレオチド

1.0 μ Mの第3オリゴヌクレオチド

13% DMSO

容量調整用蒸留水

（3）第1、第2、第3オリゴヌクレオチドとして、表4の説明に示す配列のオリゴヌクレオチドを用いてRNA増幅反応を行なった。なお、第1、第2、第3オリゴヌクレオチドの組み合わせが表4に示す組み合わせとなるよう溶液を調製した。

（4）この反応液を41℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液4.2 μ lを添加した。

【0050】

酵素液の組成（各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度）

1.7% ソルビトール

3 μ g 牛血清アルブミン

142U T7RNAポリメラーゼ（ギブコ製）

8U AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）

容量調整用蒸留水

（5）引き続きPCRチューブを41℃で30分間保温した。反応後のRNA増

幅部分を確認するため、アガロースゲル（アガロース濃度4%）電気泳動を実施した。電気泳動後の染色は市販の染色液（商品名；SYBR Green II、宝酒造（株）製）により行なった。標的RNAの特定部位にオリゴヌクレオチドが結合すると第2と第3オリゴヌクレオチドに挟まれた部分のRNAが増幅され、特定バンドが観察される。

【0051】

電気泳動結果の写真（白黒反転）を図5から図7に示した。この反応で増幅される特定バンドの鎖長は表4に示した通りである。これより表4に示したオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いたRNA増幅反応において、いずれの組み合わせにおいても特定バンドが確認できたため、これらのオリゴヌクレオチドはVT2の検出に有効であることが示された。

【0052】

【表 4】

組み合わせ	第1オリゴヌクレオチドプロンプ	第2オリゴヌクレオチドプロンプ	第3オリゴヌクレオチドプロンプ	増幅産物鎖長 (塩基数)
(g)	B2S	B2F	B4R	274
(h)	B3S	B3F	B4R	116
(i)	B3S	B3F	B5R	187
(j)	B4S	B4F	B7R	321
(k)	B5S	B5F	B7R	250
(l)	B5S	B5F	B8R	298
(m)	B7S	B7F	B9R	123

表 4 は、本実施例で用いた第 1、第 2、第 3 のオリゴヌクレオチドの組み合わせ、及びその組み合わせを用いて RNA 増幅反応させた時に増幅される特定バンドの鎖長を示す。第 1 オリゴヌクレオチドの塩基配列のうち、3' 末端の水酸基はアミノ化されている。第 2 オリゴヌクレオチドの塩基配列のうち 5' 端 1 番目の「A」から 22 番目の「A」までの部分は T7 プロモーター配列であり、それに続く 23 番目の「G」から 28 番目の「A」までの部分はエンハンサー配列で

ある。

【0053】

第1オリゴヌクレオチド

B2S (配列番号31)

B3S (配列番号32)

B4S (配列番号33)

B5S (配列番号34)

B7S (配列番号35)

第2オリゴヌクレオチド

B2F (配列番号40)

B3F (配列番号41)

B4F (配列番号42)

B5F (配列番号43)

B7F (配列番号44)

第3オリゴヌクレオチド

B4R (配列番号8)

B5R (配列番号9)

B7R (配列番号10)

B8R (配列番号11)

B9R (配列番号12)

実施例5

本願発明によるオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて、標的VT2 RNAの様々な初期コピー数における検出を行なった。

(1) 実施例2と同様のVT2標準RNAをRNA希釈液(10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor (宝酒造(株)製)、5mM DTT)を用い、 10^5 コピー/ 2.5μ lから 10^1 コピー/ 2.5μ lまでとなるよう希釈した。コントロール試験区(陰性)には希釈液のみを用いた。

(2) 以下の組成の反応液 23.3μ lを0.5ml容のPCR用チューブ(商

品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製) に分注し、これに上記RNA試料2.5 μ lを添加した。

【0054】

反応液の組成 (各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度)

60mM Tris-塩酸緩衝液 (pH8.6)

17mM 塩化マグネシウム

150mM 塩化カリウム

39U RNase Inhibitor

1mM DTT

各0.25mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

3.6mM ITP

各3.0mMのATP、CTP、GTP、UTP

0.16 μ Mの第1オリゴヌクレオチド (表4の5S、3'末端の水酸基はアミノ化されている。)

1.0 μ Mの第2オリゴヌクレオチド (表4の5F)

1.0 μ Mの第3オリゴヌクレオチド (表4の7R)

25nMのインターカラーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチド

(配列番号25、5'末端から12番目の「T」と13番目の「A」の間のリンにインターカラーター性蛍光色素が標識されている、また3'末端の水酸基はグリコール基で修飾されている)

13% DMSO

容量調整用蒸留水

(3) 上記の反応液を41℃で5分間保温後、以下の組成で、かつ、あらかじめ41℃で2分間保温した酵素液4.2 μ lを添加した。

【0055】

酵素液の組成 (各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度)

1.7% ソルビトール

3 μ g 牛血清アルブミン

142U T7RNAポリメラーゼ (ギブコ社製)

8U AMV逆転写酵素 (宝酒造 (株) 製)

容量調整用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温度調節機能付き蛍光分光光度計を用い、41℃で保温して、励起波長470nm、蛍光波長510nmで、反応溶液を経時的に測定した。

【0056】

酵素添加時の時刻を0分として、試料の蛍光増加比 (所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値) の経時変化を図8 (A) に示した。また、初期RNA量の対数値と立ち上がり時間 (蛍光増加比が陰性の平均値に標準偏差の3倍を加えた値: 1.2になるまでの時間) との関係の結果を図8 (B) に示した。なお、初期RNA量は 10^1 コピー/30 μ lから 10^5 コピー/30 μ lである。

【0057】

図8より、 10^1 コピーが約20分で検出された。標的RNAの初期濃度に依存した蛍光プロファイルと検量線が得られ、未知試料中に存在するVT2 RNAの定量が可能であることが示された。以上より、本法により、VT2 RNAの迅速・高感度な検出が可能であることが示された。

【0058】

【発明の効果】

以上に説明したように、本願発明が提供するオリゴヌクレオチドは、VT1 RNA又はVT2 RNAの分子内構造フリー領域に相補的に結合するオリゴヌクレオチドである。この結果、増幅工程を実施する前にこれらRNAの熱変性を行い、その分子内構造を壊し、プライマーの結合効率を向上させるための操作を行わなくとも、比較的低温かつ一定温度で該工程を行うRNAの検出を実施することが可能となる。したがって本願発明のオリゴヌクレオチドを使用することにより、迅速性及び簡便性はもとより、自動化に適したRNA検出方法を提供することが可能となる。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Tosoh Corporation

<120>ペロ毒素検出のためのオリゴヌクレオチド及び検出法

<130>PA211-0407

<160>44

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>VT 1 RNAに特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>1

aaaaaacatt atttgcctg

20

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> V T 1 R N A に 特 異 的 に 結 合 可 能 な オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド

<400>2

tggcgattta tctgcatccc

20

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> V T 1 R N A に 特 異 的 に 結 合 可 能 な オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド

<400>3

gatgatgaca attcagtatt

20

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> V T 1 R N A に 特 異 的 に 結 合 可 能 な オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド

<400>4

ttttattgtg cgtaatccca

20

<210>5

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 1 R N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>5

taatagttct gcgcacaga

20

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>6

tatacaggtg ttccttttgg

20

<210>7

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>7

tatatgttca agaggggtcg

20

<210>8

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 RNAに特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>8

atggtcaaaa cgcgctgat

20

<210>9

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 RNAに特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>9

tagaaagtat ttgttgccgt

20

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>10

gtaaggcttc tgctgtgaca

20

<210>11

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>11

cagtttcaga cagtcctga

20

<210>12

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>12

ttgctgattc gccccagtt

20

<210>13

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 RNAに特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>13

attatttaaag gatattctcc

20

<210>14

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 RNAに特異的に結合可能なオリゴヌクレオチド

<400>14

attgtttatt tttataacag

20

<210>15

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 1 RNA増幅用オリゴヌクレオチド

<400>15

tttttatcgc ttgctgatt ttca

25

<210>16

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 1 RNA増幅用オリゴヌクレオチド

<400>16

cgccattcgt tgactacttc ttatc

25

<210>17

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 1 RNA増幅用オリゴヌクレオチド

<400>17

tgatctcagt gggcgttctt atgta

25

<210>118

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 1 R N A 増幅用オリゴヌクレオチド

<400>18

tcatcatgca tcgcgagttg ccaga

25

<210>19

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A 増幅用オリゴヌクレオチド

<400>19

gtatatgaag tgtatattat ttaaa

25

<210>20

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>V T 2 R N A 増幅用オリゴヌクレオチド

<400>20

atatatctca ggggaccaca tcggt

25

<210>21

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>VT 2 RNA増幅用オリゴヌクレオチド

<400>21

accatcttcg tctgattatt gagca

25

<210>22

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>VT 2 RNA増幅用オリゴヌクレオチド

<400>22

ttctaccgtt ttccagattt tacac

25

<210>23

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>VT 2 RNA増幅用オリゴヌクレオチド

<400>23

cttacgcttc aggcagatac agaga

25

<210>24

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>VT 1 RNA検出用オリゴヌクレオチド

<400>24

tgtaacgtgg tatagctact

20

<210>25

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>VT 2 RNA検出用オリゴヌクレオチド

<400>25

ttaacgccag atatgatgaa

20

<210>26

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第 3 オリゴヌクレオチド

<400>26

gatcatccag tgtgtacga

20

<210>27

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第 1 オリゴヌクレオチド

<400>27

aaaaaacatt attgtcctg ttaacaaatc ctgtcacat

39

<210>28

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第 1 オリゴヌクレオチド

<400>28

tggcgattta tctgcatccc cgtaagactg atccctgca

39

<210>29

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1オリゴヌクレオチド

<400>29

gatcatccag tgtgtacga aatcccctct gtatttgcc

39

<210>30

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1オリゴヌクレオチド

<400>30

gatgatgaca attcagtatt aatgccacgc ttcccagaa

39

<210>31

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1 オリゴヌクレオチド

<400>31

tatacaggtg ttccttttgg ctgaagtaat cagcaccag

39

<210>32

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1 オリゴヌクレオチド

<400>32

tatatgttca agaggggtcg atatctctgt ccgtatact

39

<210>33

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1 オリゴヌクレオチド

<400>33

atggtcaaaa cgcgcctgat agacatcaag ccctcgtat

39

<210>34

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1オリゴヌクレオチド

<400>34

tagaaagtat ttgttgccgt attaacgaac ccggccaca

39

<210>35

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1オリゴヌクレオチド

<400>35

gtaaggcttc tgctgtgaca gtgacaaaac gcagaactg

39

<210>36

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1オリゴヌクレオチド

<400>36

aattctaata cgactcacta tagggagatt tttatcgctt tgctgatttt tca

53

<210>37

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1 オリゴヌクレオチド

<400>37

aattctaata cgactcacta tagggagacg ccattcggtg actacttctt atc

53

<210>38

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1 オリゴヌクレオチド

<400>38

aattctaata cgactcacta tagggagatg atctcagtg gcgttcttat gta

53

<210>39

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第1オリゴヌクレオチド

<400>39

aattctaata cgactcacta tagggagatc atcatgcatc gcgagttgcc aga 53

<210>40

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第2オリゴヌクレオチド

<400>40

aattctaata cgactcacta tagggagagt atatgaagtg tatattattt aaa 53

<210>41

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第2オリゴヌクレオチド

<400>41

aattctaata cgactcacta tagggagaat atatctcagg ggaccacatc ggt 53

<210>42

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第2オリゴヌクレオチド

<400>42

aattctaata cgactcacta tagggagaac catcttcgtc tgattattga gca 53

<210>43

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第2オリゴヌクレオチド

<400>43

aattctaata cgactcacta tagggagatt ctaccgtttt tcagatttta cac 53

<210>44

<211>53

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>第2オリゴヌクレオチド

<400>44

aatcttaata cgactcacta tagggagact tacgcttcag gcagatacag aga

53

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1で行なったオリゴ-1からオリゴ-6とAMV逆転写酵素を用いて、41℃でのVT1 RNA標準品の切断実験を行った後のサンプルの尿素変性6%PAGEの電気泳動写真である（白黒反転）。なお、図中名称表示の無い他のレーンについては、本実施例と無関係である。

【図2】

実施例2で行なったオリゴ-7からオリゴ-15とAMV逆転写酵素を用いて、41℃でのVT2 RNA標準品の切断実験を行った後のサンプルの尿素変性6%PAGEの電気泳動写真である（白黒反転）。なお、図中名称表示の無い他のレーンについては、本実施例と無関係である。

【図3】

実施例1で行なったVT1 RNA標準品の初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 及び 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ において、表3の組み合わせ（a）から（c）のオリゴヌクレオチドプローブを用いてRNA増幅反応させた時の4%アガロースゲル電気泳動写真。レーン1が組み合わせ（a）、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン2・3が組み合わせ（a）、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン4が組み合わせ（a）、コントロール（RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの）、レーン5が組み合わせ（b）、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン6・7が組み合わせ（b）、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン8が組み合わせ（b）、コントロール（RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの）、レーン9が組み合わせ（c）、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン10・11が組み合わせ（c）、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン12が組み合わせ（c）、コントロール（RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの）のそれぞれの結果である。いずれの組み合

わせを用いても特定バンドが確認できた。

【図4】

実施例1で行なったVT1 RNA標準品の初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 及び 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ において、表3の組み合わせ(d)から(f)のオリゴヌクレオチドプローブを用いてRNA増幅反応させた時の4%アガロースゲル電気泳動写真。レーン1が組み合わせ(d)、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン2・3が組み合わせ(d)、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン4が組み合わせ(d)、コントロール(RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)、レーン5が組み合わせ(e)、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン6・7が組み合わせ(e)、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン8が組み合わせ(e)、コントロール(RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)、レーン9が組み合わせ(f)、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン10・11が組み合わせ(f)、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン12が組み合わせ(f)、コントロール(RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)のそれぞれの結果である。いずれの組み合わせを用いても特定バンドが確認できた。

【図5】

実施例2で行なったVT2 RNA標準品の初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 及び 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ において、表4の組み合わせ(g)から(i)のオリゴヌクレオチドプローブを用いてRNA増幅反応させた時の4%アガロースゲル電気泳動写真。レーン1が組み合わせ(g)、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン2・3が組み合わせ(g)、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン4が組み合わせ(g)、コントロール(RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)、レーン5が組み合わせ(h)、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン6・7が組み合わせ(h)、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン8が組み合わせ(h)、コントロール(RNA試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)、レーン9が組み合わせ(i)、初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン10・11が組み合わせ(i)、初期RNA量 10^3 コピー/ $30\mu\text{l}$ 、レーン12が組み合わせ(i)、コントロール(RNA試料

の代わりに希釈液のみを用いたもの)のそれぞれの結果である。いずれの組み合わせを用いても特定バンドが確認できた。

【図 6】

実施例 2 で行なった VT 2 RNA 標準品の初期 RNA 量 10^4 コピー / $30 \mu\text{l}$ 及び 10^3 コピー / $30 \mu\text{l}$ において、表 4 の組み合わせ (j) から (1) のオリゴヌクレオチドプローブを用いて RNA 増幅反応させた時の 4 % アガロースゲル電気泳動写真。レーン 1 が組み合わせ (j)、初期 RNA 量 10^4 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 2・3 が組み合わせ (j)、初期 RNA 量 10^3 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 4 が組み合わせ (j)、コントロール (RNA 試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)、レーン 5 が組み合わせ (k)、初期 RNA 量 10^4 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 6・7 が組み合わせ (k)、初期 RNA 量 10^3 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 8 が組み合わせ (k)、コントロール (RNA 試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)、レーン 9 が組み合わせ (1)、初期 RNA 量 10^4 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 10・11 が組み合わせ (1)、初期 RNA 量 10^3 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 12 が組み合わせ (1)、コントロール (RNA 試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)のそれぞれの結果である。いずれの組み合わせを用いても特定バンドが確認できた。

【図 7】

実施例 2 で行なった VT 2 RNA 標準品の初期 RNA 量 10^4 コピー / $30 \mu\text{l}$ 及び 10^3 コピー / $30 \mu\text{l}$ において、表 4 の組み合わせ (m) のオリゴヌクレオチドプローブを用いて RNA 増幅反応させた時の 4 % アガロースゲル電気泳動写真。レーン 1 が初期 RNA 量 10^4 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 2・3 が初期 RNA 量 10^3 コピー / $30 \mu\text{l}$ 、レーン 4 がコントロール (RNA 試料の代わりに希釈液のみを用いたもの)のそれぞれの結果である。いずれの組み合わせを用いても特定バンドが確認できた。

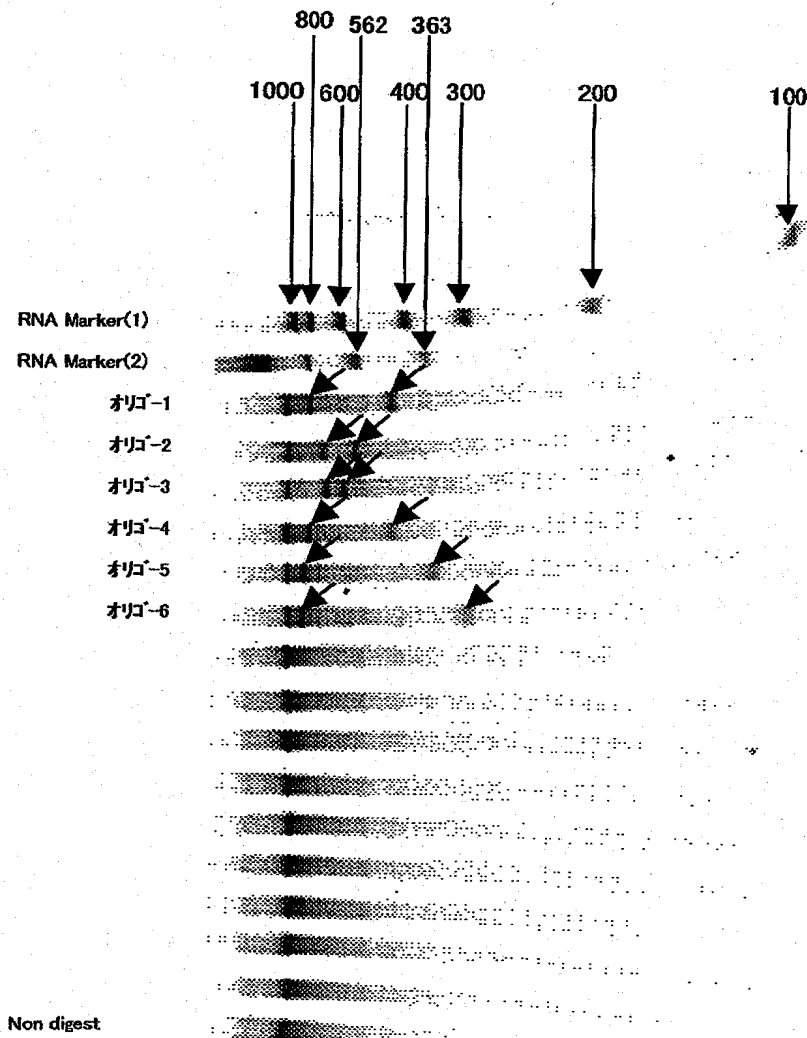
【図 8】

図 8 は実施例 4 で行なった VT 2 RNA 標準品の初期 RNA 量 10^1 コピー / $30 \mu\text{l}$ から 10^5 コピー / $30 \mu\text{l}$ において、反応時間と RNA の生成とともに増大する蛍光強度比のグラフ (左) 及び初期 RNA 量の対数値と検出時間 (

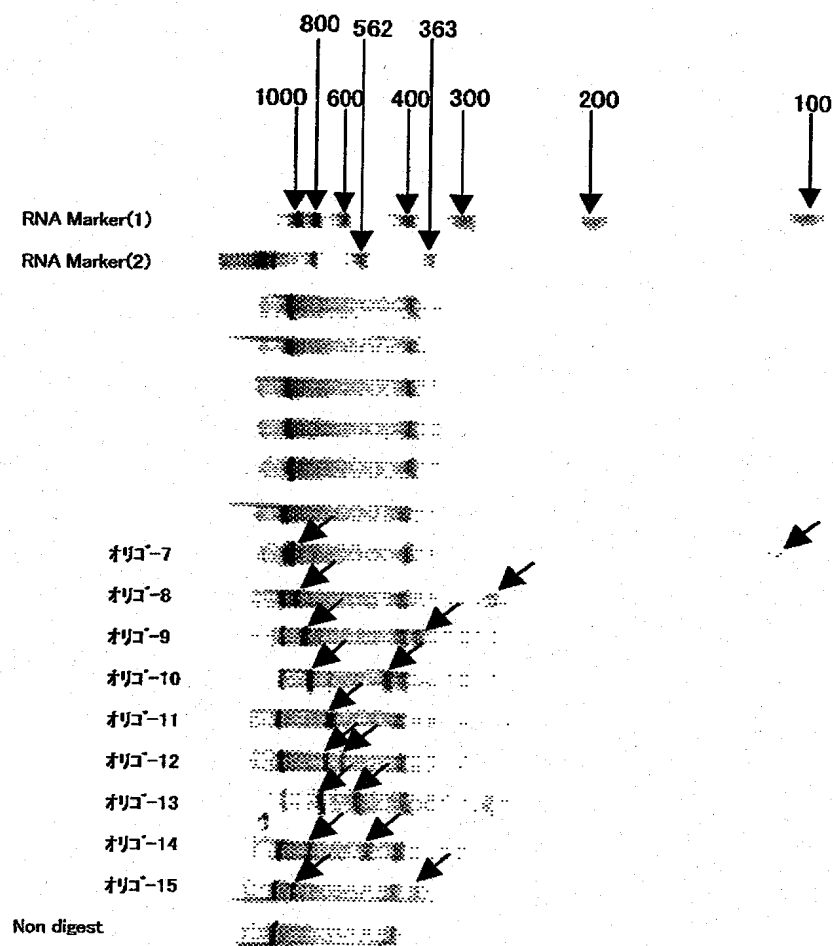
蛍光強度比が1.2となる時刻)との間で得られた検量線(右)である。図中、四角は 10^5 コピー、丸は 10^4 コピー、三角は 10^3 コピー、ひし形は 10^2 コピー、プラスは10コピー、そしてバツはコントロールについての結果である。初期コピー数 10^1 コピー/ $30\mu\text{l}$ のRNAが反応約20分で検出でき、初期RNA量と検出時間との間に相関関係のあることが示された。

【書類名】 図面

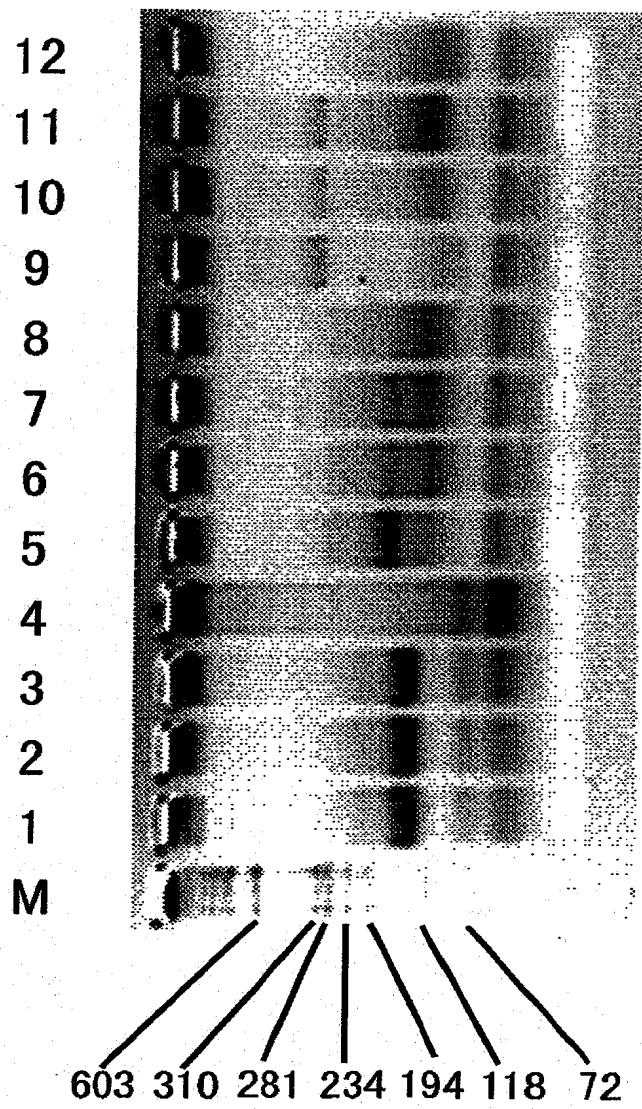
【図1】



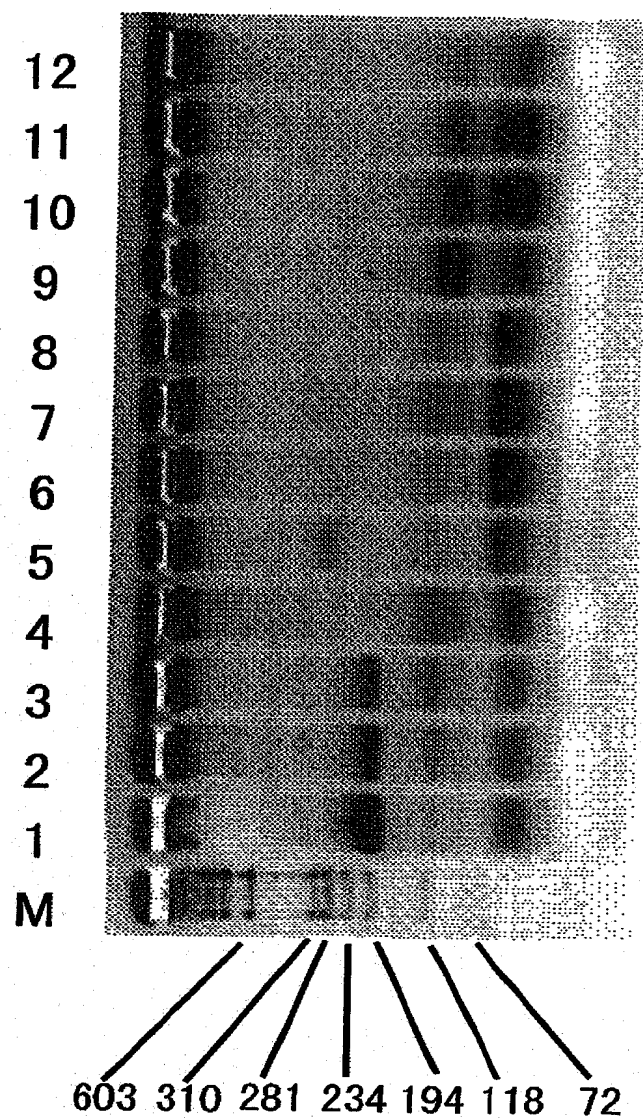
【図2】



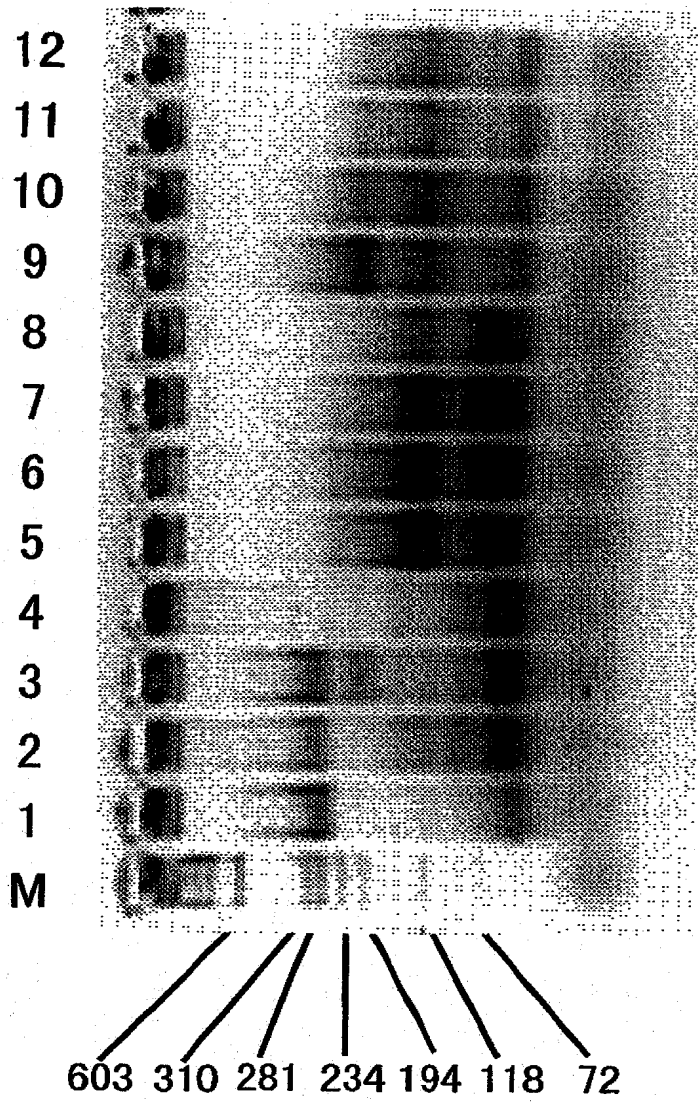
【図 3】



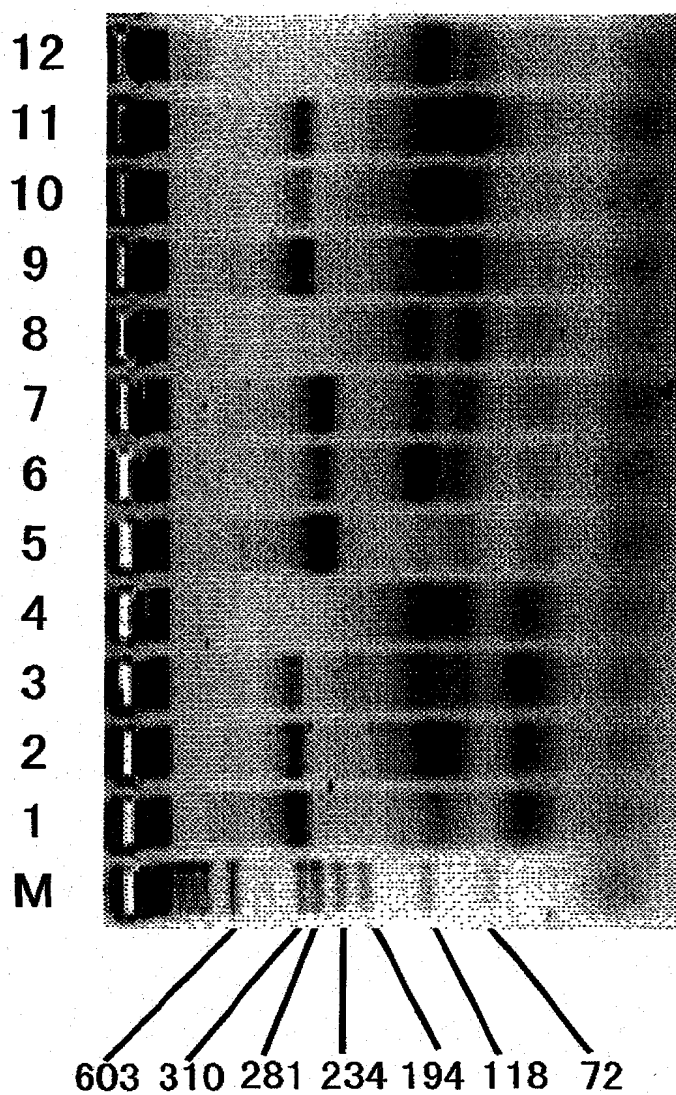
【図4】



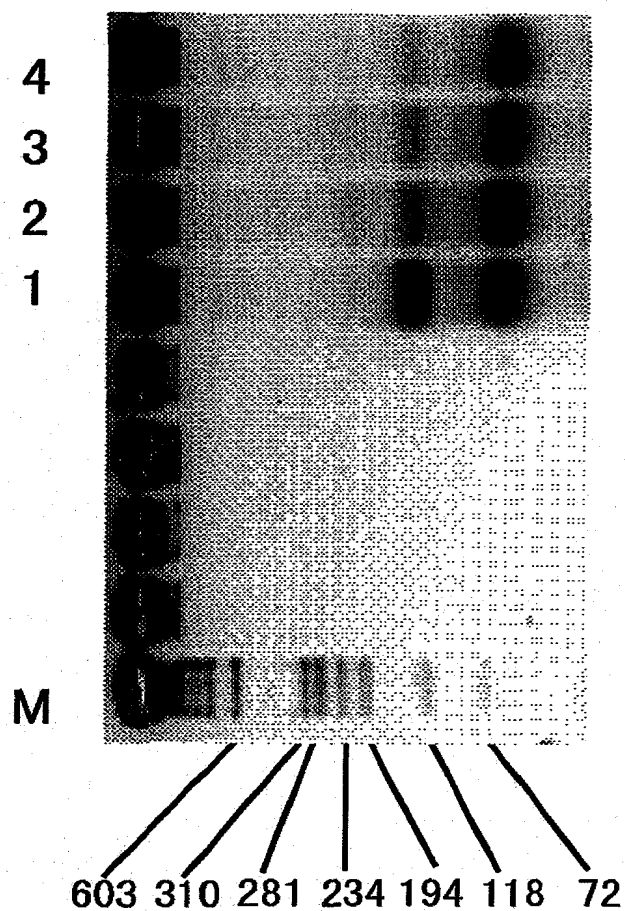
【図5】



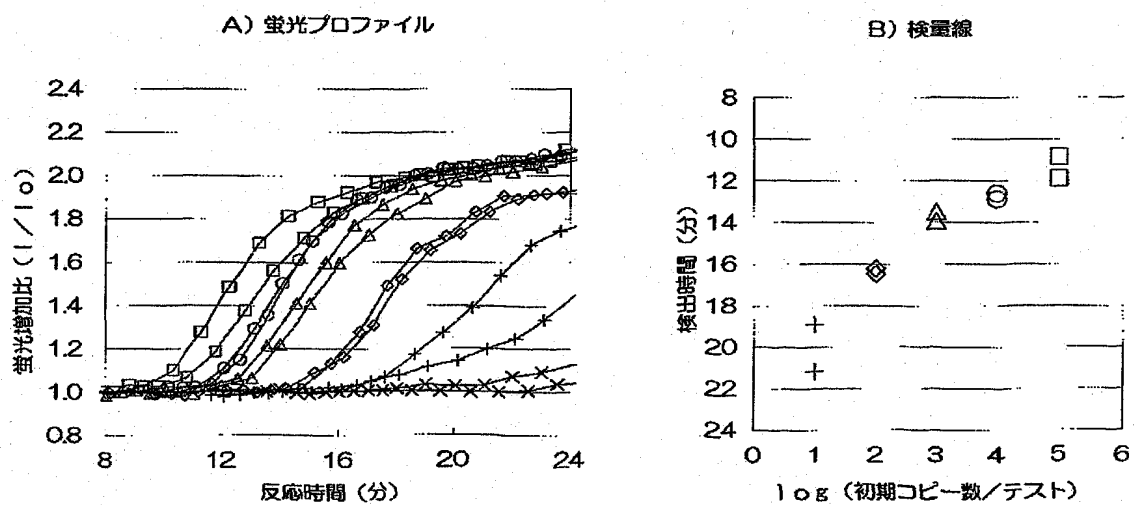
【図6】



【図 7】



【図 8】



特2001-058143

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 分子内構造フリー領域に対して設計されたオリゴヌクレオチドとそれらを用いた一定温度核酸増幅法を提供する。

【解決手段】 ペロ毒素1型遺伝子VT1 RNA及びペロ毒素2型遺伝子VT2 RNAを検出するためのオリゴヌクレオチドで、比較的低温で、VT1 RNA及びVT2 RNAに特異的に結合するオリゴヌクレオチドと、それらを用いた一定温度核酸増幅法からなるペロ毒素1型遺伝子VT1 RNA又はペロ毒素2型遺伝子VT2 RNAの検出方法を提供する。

【選択図】 図1

特2001-058143

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2001-058143

受付番号

50100297689

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成13年 3月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成13年 3月 2日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003300]

1. 変更年月日 1990年12月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 山口県新南陽市開成町4560番地

氏 名 東ソー株式会社